

H200/99.

PCT/HU00/00099 #2

10/088,989

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 24 OCT 2000	
WIPO	PCT

4

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

# ELSŐBBSÉGI TANÚSÍTVÁNY

Ügyszám: P9903226

A Magyar Szabadalmi Hivatal tanúsítja, hogy

Gyógyszerkutató Intézet, Budapest,

Magyarországon

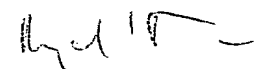
1999. 09. 23. napján 35920/99 iktatószám alatt,

Eljárás mikofenolsav és származékai előállítására

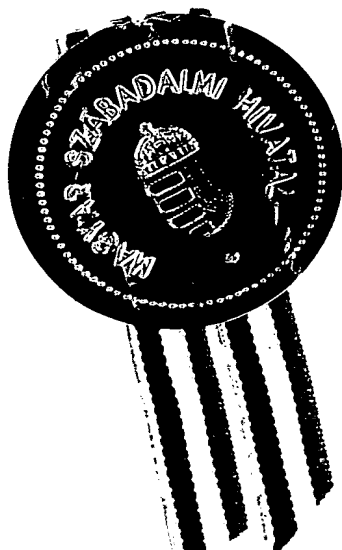
című találmányt jelentett be szabadalmazásra.

Az idefűzött másolat a bejelentéssel egyidejűleg benyújtott melléklettel mindenben megegyezik.

Budapest, 2000. év 09. hó 29. napján

  
a Szabadalmi Főosztály vezetője

The Hungarian Patent Office certifies in this priority certificate that the said applicant(s) filed a patent application at the specified date under the indicated title, application number and registration number. The attached photocopy is a true copy of specification filed with the application.



322.6/99

35900

1999 SZÉPT 23.

ELSŐBBSÉGI PÉLDÁNY

### SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

Eljárás mikofenolsav és származékai előállítására  
Gyógyszerkutató Intézet Kft., Budapest

#### *Feltalálók:*

Kónya Attila, Szolnok	(25%)
Jekkel Antalné dr., Budapest	(16,5%)
Barta István, Budapest	(16,5%)
Somogyi György, Budapest	(8%)
Dr. Ambrus Gábor, Budapest	(6%)
Dr. Horváth Gyula, Budapest	(6%)
Mózesné Sütő Julianna, Budapest	(6%)
Dr. Szabó István Mihály, Budapest	(5%)
Dr. Szabó Antal, Szentendre	(5%)
Salát János, Budapest	(4%)
Boros Sándor, Sződ	(2%)

A bejelentés napja: 1999.09. 23.

A találmány tárgya mikrobiológiai eljárás az (I) képletű mikofenolsav ( $R_1$  jelentése metil-csoport és  $R_2$  jelentése hidroxil-csoport) és származékai [(I) képletben  $R_1$  jelentése metil-csoport vagy hidroximetil-csoport, továbbá  $R_2$  jelentése amino-csoport] előállítására. Az (I) képletű mikofenolsavat [kémiai neve: (E)-6-(1,3-dihidro-4-hidroxi-6-metoxi-7-metil-3-oxo-5-izobenzofuranil)-4-metil-4-hexénsav] a gyógyászatban immunsuppresszív hatása alapján alkalmazzák.

A mikofenolsavat először *Penicillium glaucum* fermentlevében mutatták ki 1896-ban [cit post: Jones, E.L. és munkatársai, J. Invest. Dermatol., 65, 537 (1975)], majd később más, a *Penicillium* genusba tartozó fajok, pl. *P. brevicompactum*, *P. stoloniferum*, *P. echinulatum*, *P. roqueforti* és *P. viridicatum* fermentlevéből is izolálták. A szerkezeti képletét 1952-ben határozták meg [Birkinshaw, J.M. és munkatársai, Biochem. J., 50, 630 (1952)]. A felfedezést követően leírták antibakteriális hatását, azonban patogén *Staphylococcus* törzsek gyorsan rezisztensé váltak ellene, így ebben az irányban nem fejlesztették tovább [Abraham, E.P. és munkatársai, Biochem J., 39, 398 (1945)]. A vegyület antifungális hatását is kimutatták néhány *Epidermophyton* és *Trichophyton* törzs ellen, valamint antivirális hatása is igazolást nyert többek között Herpes simplex vírussal szemben [Williams, R.H. és munkatársai, J. Antibiot., 21, 463 (1968)]. Ugyancsak leírták daganatellenes hatását is, amelynek intenzív kutatása az elmúlt években kezdődött meg [Sidi, Y. és munkatársai, Br. J. Cancer, 58, 61 (1988)]. Gyógyászati alkalmazást, mint immunsuppresszív hatóanyag, a 80-as évek második felében leírt morfolino-etil észter származéka nyert.

A mikofenolsav széleskörű biológiai aktivitása azzal magyarázható, hogy gátolja az inozin 5'-monofoszfát dehidrogenáz és a guanin 5'-monofoszfát szintetáz enzimek aktivitását, melynek következtében a guanin szintézis csökken. A guanin szintézis egyes sejtekben egy másik úton, a hipoxantin-

guanin-foszforibozil-transzferáz enzim által is megvalósulhat. Ez azonban hiányzik a T- és a B-limfocitákban, így ezek szaporodását a mikofenolsav szelektíven gátolja.

A hetvenes évektől kezdve számos mikofenolsav származékot előállítottak. Az izobenzofuranil gyűrűn és a 4-metil-4-hexénsav oldalláncon is végrehajtottak módosításokat mikrobiológiai illetve kémiai úton is [Jones, D.F. és munkatársai, J. Chem. Soc., 1725 (1970)]. Egyes mikofenolsav származékok daganatellenes tesztekben a mikofenolsavval közel azonos aktivitást mutattak [Sweeney, M.J. és munkatársai, Cancer Research, 32, 1795 (1972)]. Előállítottak olyan mikofenolsav származékokat is, amelyek az inozin 5'-monofoszfát dehidrogenázt a mikofenolsavhoz képest hatékonyabban gátolták [Sweeney, M.J. és munkatársai, Cancer Research, 32, 1803 (1972)].

A találmány célja egyrészt olyan mikroorganizmus elkülönítése és fejlesztése, amely felhasználásával az irodalomban ismert megoldásoknál előnyösebben tudunk mikofenolsavat előállítani. A találmány célja továbbá mikrobiológiai eljárás biztosítása mikofenolsav és új, potenciálisan gyógyászatilag hatékony mikofenolsav származékok előállítására.

Az új, mikrobiológiai eredetű hatóanyagok keresését célzó kutatásaink során különböző földrajzi helyekről gyűjtött talajmintákból izolált mikroorganizmusokat vizsgáltunk meg. Az antifungális screen-program keretében izoláltunk egy fonalas gomba törzset, amelynek fermentleve mikofenolsavat tartalmazott. E törzsből mutációs-szelekciós módszerek alkalmazásával állítottunk elő egy mutáns törzset, amely magas koncentrációban termeli a mikofenolsavat. Mutációs ágensként ultraibolya besugárzást és N-metil-N-nitro-N'-nitrozo-guanidint alkalmaztunk.

A mikofenolsav bioszintézisét leírták *Penicillium glaucum*, *Penicillium stoloniferum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium scabrum*, *Penicillium nagemi*, *Penicillium patrismei*, *Penicillium griseobrunneum* és *Penicillium viridicatum* törzsek esetében. A mikofenolsav bioszintézise során eltérő úton képződik a molekula izobenzofurán gyűrűs része, illetve a hozzá kapcsolódó héttagú oldallánc. Az oldallánc bioszintézise a szteránváz szintézisét követi farnezil-pirofoszfátig. Az izobenzofurán gyűrűs molekularészlet egy acetil-CoA-ból és három malonil-CoA-ból képződik. Az aromás gyűrűhöz kapcsolódó metil-csoport S-adenozil-metioninból épül be a molekulába. Az izobenzofurán gyűrű 6-os szénatomjához kapcsolódik a farnezil-pirofoszfát, amelyből egy nyolctagú lánc kihasadása után marad vissza a héttagú oldallánc. A bioszintézis utolsó lépése a metoxi-csoport kialakulása S-adenozil-metionin felhasználásával [Muth, W.L. és munkatársai, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8, 321 (1975)].

A szakirodalomban leírt valamennyi mikofenolsavat termelő törzs a *Penicillium* genuson belül az *Assymetrica* szekcióba tartozik. Az általunk izolált törzs a taxonómiai meghatározás alapján a *Penicillium* genuson belül a *Monovercillata* szekcióba tartozó *Penicillium waksmani* fajba sorolható be, amelyről az irodalomban eddig nem írták le a mikofenolsav termelőképeséget.

Az új izolátum rendszertani meghatározását az alábbiakban adjuk meg.

Általános kulturális-morfológiai jellemvonások:

Az új törzs-izolátum konidiofórumainak felépítése és ezek ágainak, metuláinak továbbá a fialidoknak elrendeződése tekintetében jellegzetes képviselője a *Penicillium* genusnak. Sporuláló légmicéliuma általában bársonyos, fejlett. Érett állapotban keményítő-ammonium-szulfát agaron: sötét barnásszürke; Sabouraud pepton - glükóz agaron: világos barnásszürke; Sabouraud glükóz agaron: sötétszürke; aszparagin-glicerín agaron: világoszöld; Czapek (nitrát-

szacharóz) marhavéres agaron: barnásfekete; egyszerű Czapek agaron: sötét barnásszürke; maláta agaron: sötétedő zöld; malátakivonat - élesztőkivonat - glükóz agaron: sötétedő barnásszürke; zabpehely agaron: sötét barnásszürke. Azokon a tápközegeken, melyeken az érett légmicélium szürke vagy barnásszürke, a léghifák tömege kezdetben gyakran zöld vagy kékeszöld. A törzs szubsztrátmicéliuma általában színtelen vagy halvány sárgásbarna. Oldódó pigment termelése egyetlen közegen sem volt tapasztalható. A telepek felülete kevéssé ráncolódó. A légmicélium átlagos vastagsága 1-3 mm-t nem haladja meg. Melanoid-pigment termelés (tirozináz aktivitás): negatív.

A konidiofórumok hosszúsága rendkívül változó: gyakorta közvetlenül a szubsztrátmicéliumból nőnek ki, máskor hosszabb tengelyfonal oldalsó leágazásai (lásd 1. ábra **a-f** konidiofórum típusok, az **a**, **d**, **e** és **f** aszparagin - glicerín agaron, a **b** maláta agaron, míg a **c** keményítő - ammónium-szulfát agaron, **g** konidiumlánc). A törzs a Monoverticillata fajcsoportba sorolható tekintve, hogy túlnyomó többségében egyetlen fialida örvből álló ecseteket hordoz. Az ilyen Monoverticillata típusú ecsetek nagyon gyakran "divaricata" módon (előállóan) rendezettek (lásd 1. ábra). Esetenként biverticillium típusú konidiofórumok is észlelhetők (lásd 1. ábra). A fialidok alkotta örvök 2-8 (túlnyomóan 3) tagúak lehetnek. A konidiumok gömbölyűek, inkább sima felületűek, méretük 2-25 µm. A konidiumláncokban az egyes konidiumok száma meghaladhatja a 20-at.

#### Élettani tulajdonságok:

Eszkulin hidrolízis: pozitív. Kénhidrogén termelés: negatív. NaCl-tolerancia: maximum 3 %-ig. pH-tolerancia: 3,0-9,0 értékek között. Nitrátból nitrit, ammónia vagy gázképzés nem volt kimutatható. Kataláz-teszt: pozitív. Oxidáz-teszt: pozitív. Urea-bontás: pozitív. Lecitináz és gelatináz aktivitás: pozitív. Gyenge keményítő hidrolízis. Tween-20 hidrolízis: pozitív, de a Tween-40 és -60

hidrolízise nagyon gyenge. A szerves savak nátrium sói közül jól növekedik benzoáton, szaliciláton, gyengén acetáton, tartaráton és szukcináton. Egyáltalán nem, vagy csak nyomokban malonáton, piruváton, laktáton és citráton. Kitűnően értékesíti a glükózt, fruktózt, arabinózt, xilózt, ramnózt, szacharózt, raffinózt, mannitot és inozitot. Erőteljes savtermelését észleltük (brómkrezol-bibor indikátorral Gordon, R.E. (1973) tápközegén): glükózon, szacharózon, ramnózon, dextrinen, melibiózon, maltózon, raffinózon, fruktózon, inoziton, inulinon, glicerinen xilózon, dulciton és manniton. A savtermelés galaktózon, arabinózon és szalicinen gyenge volt.

#### Rendszertani helyzet:

Az általunk izolált, mikofenolsavat termelő *Penicillium* törzset a *Penicillium waksmani* faj egy közeli változatának tekinthetjük. Ezt az azonosítást igazolják a bemutatott 1. táblázat adatai is.

1. táblázat

A *Penicillium waksmani* összehasonlítása az általunk izolált, mikofenolsavat termelő *Penicillium* törzs diagnosztikai bélyegeivel

	<i>Penicillium waksmani</i>	Az új <i>Penicillium</i> törzs-izolátum
Az érett légmicélium színe	Kékeszöld→sötétzöld→ →olajszürke→szürke	Kékeszöld→sötétzöld→ →szürke→barnásszürke
Szubsztrát micélium	színtelen	színtelen
Oldódó pigment	nincs	nincs
Konídiumok alakja és mérete	gömbölyű; 2-2,5 µm	gömbölyű; 2-2,5 µm
Egyetlen fialida örvből álló ecsetek	uralkodó típus	uralkodó típus
Biverticillium típusú konidioforumok	előfordulnak	előfordulnak

A találmány egyrészt azon a felismerésen alapul, hogy az általunk izolált mikofenolsavat termelő *Penicillium waksmani* törzs, amelyet mutációs-szelekciós módszerekkel történő fejlesztése után NCAIM (P)F 001269 számon letétbe helyeztünk a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetemen (Budapest) a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében - alkalmas fermentációs körülmények között magas koncentrációban mikofenolsavat termel.

A találmány alapját képezi továbbá az a felismerésünk is, hogy a talajmintából ugyancsak általunk izolált *Streptomyces* sp., illetve *Streptomyces resistomycificus* tenyésztete a képződött mikofenolsavat olyan (I) általános képletű vegyületté képes átalakítani, ahol  $R_1$  jelentése metilcsoport, illetve hidroximetilcsoport és  $R_2$  jelentése aminocsoport.

A fentiek alapján a találmány tárgya mikrobiológiai eljárás az (I) általános képletű vegyületek előállítására, ahol  $R_1$  jelentése metil- vagy hidroximetilcsoport, továbbá  $R_2$  hidroxil- vagy aminocsoportot jelent, amely abban áll, hogy a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM (P)F 001269 számon letétbe helyezett *Penicillium waksmani* gombatörzset asszimilálható szén- és nitrogénforrásokat, valamint ásványi sókat tartalmazó táptalajon 22-30°C-on tenyésztjük és a képződött (I) általános képletű vegyületet, ahol  $R_1$  jelentése metilcsoport és  $R_2$  jelentése hidroxilcsoport, a fermentléből elkülönítjük és kívánt esetben tisztítjuk, majd kívánt esetben

- a) olyan (I) általános képletű vegyület előállítására, ahol  $R_1$  jelentése metilcsoport és  $R_2$  jelentése aminocsoport, a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM (P)B 001275 számon letétbe helyezett *Streptomyces* sp. baktérium törzs tenyésztetével vagy
- b) olyan (I) általános képletű vegyület előállítására, ahol  $R_1$  jelentése hidroximetilcsoport és  $R_2$  jelentése aminocsoport, a Mezőgazdasági és



Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM (P)B 001276 számon letétbe helyezett *Streptomyces resistomycificus* baktérium törzs tenyészetével

asszimilálható szén- és nitrogénforrásokat, valamint ásványi sókat tartalmazó táptalajon, süllyesztett, levegőztetett körülmények között a biokonverzió befejeződéséig fermentáljuk, majd a keletkező (I) általános képletű vegyületet a tenyészetből elkülönítjük és kívánt esetben tisztítjuk.

A találmány értelmében a mikofenolsav előállítására a *Penicillium waksmani* gomba törzs tenyészetét használjuk, amely szénforrásként jól hasznosítja a glükózt, maltózt, szacharózt, glicerint, malátakivonatot és a vízdoldható keményítőt. Nitrogénforrásként élesztőkivonatot, pepton, húskivonatot, kazeint, tripcasint, szójaliszt, kukoricalekvárt, nátrium-nitrát, ammónium-szulfát alkalmazhatók.

A mikofenolsav termelésére szolgáló táptalajokban a fenti szén- és nitrogénforrásokon kívül ásványi sók, pl. magnézium-szulfát, aminosavak, vitaminok és habzásgátlók lehetnek jelenek.

A mikofenolsav előállítására szolgáló találmány szerinti eljárás egy előnyös kiviteli módja szerint úgy járunk el, hogy a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetemen, a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM (P)F 001269 számon letétbe helyezett *Penicillium waksmani* törzs ferdeagar tenyészetéről desztillált vízzel spóraszuszpenziót készítünk. Ezen spóraszuszpenzióval inokulum táptalajt oltunk, majd a 3 napos, 24-28°C-on, előnyösen 25°C-on növesztett inokulum tenyészetével termelő táptalajt oltunk, melyet 7 napig 22-28°C-on, előnyösen 25°C-on inkubálunk. A tenyésztést aerob körülmények között végezzük, melynek során a pH 3,5 és 7,5 értékek között változik. A főfermentációs szakaszban a levegőbevezetés: 120 liter/óra, a keverő fordulatszáma pedig: 400/perc.

Fermentáció közben a fermentlé hatóanyag tartalmát nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel illetve vékonyrétegekromatográfiával

kapcsolt denzitometriával határozzuk meg. Amikor a tenyészet a legnagyobb koncentrációban tartalmazza a mikofenolsavat, a fermentációt leállítjuk. A fermentlé nagynyomású folyadékkromatográfiás analízisének metanollal 4-szeresére hígított fermentlé minták centrifugált felülúszóját használjuk (készülék: LKB izokratikus rendszer; oszloptöltet: Nucleosil C<sub>18</sub> 5 µm (BST); előtét kolonna - 40x4 mm, analitikai kolonna - 250x4,6 mm; termosztálva 25°C-on; mérés 238 nm-nél; eluens: acetonitril-foszforsavval pH = 2-es értékre állított víz (60:40), áramlási sebesség: 1,0 ml/perc, injektálási térfogat: 10 ml). A mikofenolsav retenciós ideje 15,8 perc.

Az olyan (I) általános képletű vegyület, ahol R<sub>1</sub> jelentése metilcsoport és R<sub>2</sub> jelentése aminocsoport, előállítására szolgáló találmány szerinti eljárás egy előnyös kiviteli módja szerint úgy járunk el, hogy a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetemen, a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM (P)B 001275 számon letétbe helyezett *Streptomyces sp. 1/6* jelű törzs ferdeagar tenyészetéről desztillált vízzel spóraszuszpenziót készítünk. Ezen spóraszuszpenzióval inokulum táptalajt oltunk, majd a 3 napos, 25-37°C-on, előnyösen 28°C-on növesztett inokulum tenyészzel termelő táptalajt oltunk, melyet 3 napig 25-32°C-on, előnyösen 28°C-on inkubálunk. A tenyészethez adagoljuk a mikofenolsavat, majd a tenyésztést további 7 napig folytatjuk.

Az olyan (I) általános képletű vegyület, ahol R<sub>1</sub> jelentése hidroximetil-csoport és R<sub>2</sub> jelentése aminocsoport, előállítására szolgáló találmány szerinti eljárás egy előnyös kiviteli módja szerint úgy járunk el, hogy a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetemen, a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM (P)B 001276 számon letétbe helyezett *Streptomyces resistomycificus 1/28* jelű törzs ferdeagar tenyészetéről desztillált vízzel spóraszuszpenziót készítünk. Ezen spóraszuszpenzióval inokulum táptalajt oltunk, majd a 3 napos, 25-37°C-on, előnyösen 28°C-on növesztett inokulum

tenyésztettel termelő táptalajt oltunk, melyet 3 napig 25-32°C-on, előnyösen 28°C-on inkubálunk. A tenyészethez adagoljuk a mikofenolsavat, majd a tenyésztést további 7 napig folytatjuk.

A találmány szerinti eljárás(oka)t az alábbi példákkal szemléltetjük:

#### 1. példa

A *Penicillium waksmani* [NCAIM (P)F 001269] jelű mutáns törzset, amely a mikofenolsavat magas koncentrációban bioszintetizálja, N-metil-N-nitro-N'-nitrozoguanidinnel végzett mutációs-szelekciós kísérletben állítottuk elő. A talajmintából izolált, mikofenolsavat bioszintetizáló *Penicillium waksmani* törzset MS jelű ferdeagaron növesztettük 25°C-on 10 napig.

MS táptalaj összetétele:

glükóz	4 g
maláta kivonat	10 g
élesztő kivonat	4 g
agar	20 g
1000 ml desztillált vízben	

A ferdeagar tenyészetéről 5 ml steril, 0,1 M foszfát pufferrel (pH 8,0) mostuk le a spórákat. A spóraszuszpenzióhoz N-metil-N-nitro-N'-nitrozoguanidint adtunk 1 mg/ml végkoncentrációban. A szuszpenziót 28°C-on rázattuk 150 fordulat/perc sebességgel 35 percig. Ezt követően a spórákat 5000 fordulat/perc sebességgel centrifugálva kiülepítettük, majd felszuszpendáltuk steril desztillált vízben. A szuszpenziót MS jelű agarlemezre szélesztettük. A lemezeket 10 napig inkubáltuk 25°C-on, majd a kinőtt telepeket MS jelű táptalajra oltottuk. A kinőtt ferdeagar tenyészetek mikofenolsav termelőképességét a 2. példában leírt módon, rázatott lombikos kísérletekben vizsgáltuk meg.

2. példa

A *Penicillium waksmani* [NCAIM (P)F 001269] jelű törzs malátakivonat-élesztőkivonat tartalmú ferdeagaron növesztett 7-10 napos tenyészetéről 5 ml steril desztillált vízzel lemossuk a spórákat és ezzel a spóraszuszpenzióval 500 ml-es Erlenmeyer lombikban sterilizett 100 ml MI jelű inokulum táptalajt oltunk, melynek összetétele a következő:

## MI jelű táptalaj összetétele:

glükóz	40	g
kazein hidrolizátum	5	g
nátrium-nitrát	3	g
kálium-dihidrogén-foszfát	2	g
kálium-klorid	0,5	g
magnézium-szulfát	0,5	g
vas-szulfát	0,01	g
1000 ml csapvízben		

A táptalaj pH-ját sterilizálás előtt 6,0 értékre állítjuk és a sterilizálást 121°C-on, 25 percig végezzük. A tenyészetet malomszita rázógépen (250 fordulat/perc, 2,5 cm kitérés) 3 napig rázatjuk, majd a kapott inokulum rázott tenyészet 5-5 ml-ével 50 db, 500 ml-es Erlenmeyer lombikban, 25 percig, 121°C-on sterilizett 100 ml A2 jelű táptalajt oltunk be.

## A2 jelű táptalaj összetétele:

glükóz	80	g
tripkazin	10	g
1000 ml csapvízben.		

A sterilizést 121°C-on, 25 percig végezzük. A lombikot malomszita rázógépen (250 fordulat/perc, 2,5 cm kitérés) 7 napig 25°C-on rázatjuk. A fermentlé hatóanyagtartalmát HPLC-s módszerrel határozzuk meg. A fermentációt 168 óráig folytatjuk, majd a fermentléből kinyerjük a mikofenolsavat. 5 liter fermentléből, amely a fermentáció leállásakor 3100 mg/l mikofenolsavat tartalmaz, az alábbi módon izoláljuk a terméket.

A fermentáció befejezése után a fermentlé kémhatását  $\text{pH} = 3,2 \pm 0,2$ -re állítjuk 20 tömeg%-os kénsav oldattal, majd a savas fermentlét 2500 ml metilén-kloriddal 1 órán át kevertetjük. Ezt követően a fázisokat szétválasztjuk, majd a vizes fázist az előbbieken leírt módon 3x1250 ml metilén-kloriddal extraháljuk. Az egyesített, mikofenolsavat tartalmazó metilén-kloridos extraktumot 1x500 ml és 2x250 ml 5 tömeg%-os nátrium-hidrogén-karbonát oldattal kivonatoljuk. Az egyesített, mikofenolsav-nátriumot tartalmazó lúgos vizes oldatot <20°C-ra hűtjük és az oldat kémhatását 20 tömeg%-os kénsav oldattal  $\text{pH} = 3,2 \pm 0,2$ -re állítjuk. A kapott savas oldatot 3x280 ml metilén-kloriddal kivonatoljuk, majd az egyesített metilén-kloridos extraktumot vákuumban bepároljuk. A kapott bepárlási maradékot forrás közben 110 ml benzolban oldjuk és 30 percen át 1,1 g aktív szénrel derítjük. Az aktív szén kiszűrése után a szűrőfelületet kétszer forró benzollal átmoszuk. Az egyesített benzolos szűrletet vákuumban bepároljuk, majd a kapott nyerterméket forrás közben, 45 ml benzolban oldjuk. Ezt követően a kapott oldatot szobahőmérsékletre hűtjük, majd egy éjszakán át 0-5°C-on állni hagyjuk. A kristályokat kiszűrjük, majd egyszer hűtött benzollal és kétszer n-hexánnal mossuk. A kapott terméket vákuumban 50-60°C-on szárítjuk. Ezt követően a szárított terméket 55 ml etilalkoholban oldjuk 60°C-os külső hőmérsékleten és a kapott oldathoz kevertetés közben 22 ml ionmentes vizet csepegtetünk. Az oldatot szobahőmérsékletre hűtjük, majd egy éjszakán át 0-5°C-on állni hagyjuk. A kristályokat kiszűrjük, majd egyszer etanol - víz (4:10) eleggyel és kétszer n-hexánnal mossuk, végül vákuumban, 50-60°C-on súlyállandóságig szárítjuk. Így 9,0 g tiszta mikofenolsavat kapunk.

Olvadáspont: 141°C.

A kapott termék spektroszkópai jellemzői:

Ultraibolya színekép (20 mg/ml-es töménységben, 96%-os etanolban, 1 cm-es rétegvastagság):

$\lambda_{\max}$ (nm)	e	log e	Hozzárendelés
215	44640	4650	aromás sáv
249	9250	3966	konjugációs sáv
304	4950	3694	C=O n→p <sup>*</sup> átmenet

IR: 3415; 1745; 1710; 1625 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> = 0 ppm): 5,16 (s, 2H, H<sub>2</sub>-1); 3,75 (s, 3H, 6-OCH<sub>3</sub>); 2,0 (s, 3H, 7-CH<sub>3</sub>); 2,42 (t, J=8 Hz, 2H, H<sub>2</sub>-2'); 2,30 (t, J=8 Hz, 2H, H<sub>2</sub>-3'); 1,80 (s, 3H, 4'-CH<sub>3</sub>); 5,25 (t, J=6.6 Hz, 1H, H-5'); 3,38 (d, J=6,6 Hz, 2H, H<sub>2</sub>-6')

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub> = 0 ppm): 70,0, t (C-1); 172,8, s (C-3); 106,2, s (C-3a); 153,5, s (C-4); 116,7, s (C-5); 163,6, s (C-6); 60,9, q (6-OCH<sub>3</sub>); 122,0, s (C-7); 11,5, q (7-CH<sub>3</sub>); 144,0, s (C-7a); 179,4, s (C-1'); 32,7, t (C-2'); 34,1, t (C-3'); 133,8, s (C-4'); 16,0, q (4'-CH<sub>3</sub>); 122,9, d (C-5'); 22,5, t (C-6')

Tömegspektrumok

Elektron ionizációs (EI) tömegspektrum

Jellemző spektrum adatok:

EI:  $m/z$  320 ([M]<sup>+</sup>);  $m/z$  302 ([M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>);  $m/z$  247 ([M - <sup>•</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-COOH]<sup>+</sup>);  $m/z$  229 ([247 - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>);  $m/z$  207 ([C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>);  $m/z$  159 ([C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)

Kémiai ionizációs (CI) tömegspektrum

Jellemző spektrum adatok:

CI:  $m/z$  321 ( $[M + H]^+$ );  $m/z$  320 ( $[M]^{+\bullet}$ );  $m/z$  303 ( $[M + H - H_2O]^+$ )

### 3. példa

A 2. példában leírt módon készített inokulum rázott tenyészet 250 ml-ével oltunk 5 literes hasznos térfogatú laboratóriumi fermentorban 45 percig, 121°C-on sterilizett 5 liter A2 jelű termelő táptalajt. A beoltást követően a fermentort 25°C-on, óránként 120 liter steril levegőt átbuborékolgatva, és a keverőt 400/perc fordulatszámmal működtetve üzemeltetjük. A fermentációt 168 óráig folytatjuk, majd a fermentléből kinyerjük a mikofenolsavat. A kapott 4,9 liter fermentlé a fermentáció végén 2000 mg/l mikofenolsavat tartalmaz. A fermentléből a mikofenolsav kinyerése a 2. példában leírt módon történik.

### 4. példa

A *Streptomyces* sp. 1/6 jelű törzs (NCAIM (P)B 001275) CM jelű ferdeagaron növesztett tenyészetéről sejtszuszpenziót készítünk.

A CM jelű agar táptalaj összetétele a következő:

glükóz	25 g
pepton	2 g
élesztőkivonat	1 g
magnézium-szulfát-víz (1:7)	0,5 g
kálium-dihidrogén-foszfát	5 g
agar	20 g

1000 ml desztillált vízben.

Best Available Copy

A szuszpenzió 5 ml-ével 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban sterilizált 100 ml MB jelű inokulum táptalajt oltunk, melynek összetétele a következő:

glükóz	20	g
malátakivonat	30	g
élesztőkivonat	10	g
magnézium-szulfát-víz (1:7)	1	g
1000 ml csapvízben.		

A táptalaj pH-ját sterilizálás előtt 7,0 értékre állítjuk, a sterilizálást 121°C-on, 25 percig végezzük. A tenyészeteket síkrázógépen (250 fordulat/perc, 2,5 cm kitérés) 28°C-on, 3 napig növesztjük, majd az így kapott inokulum tenyészet 5-5 ml-ével 50 db 500 ml-es Erlenmeyer lombikban sterilizált 100-100 ml MBT jelű biokonverziós táptalajt oltunk, melynek összetétele a következő:

glükóz	20	g
malátakivonat	10	g
szójaliszt	5	g
pepton	10	g
magnézium-szulfát-víz (1:7)	1	g
kálium-dihidrogén-foszfát	1	g
1000 ml csapvízben.		

A táptalaj pH-ját sterilizálás előtt 10 %-os vizes kénsav oldattal 7,0 értékre állítjuk, a sterilizálást 121°C-on, 25 percig végezzük. A glükózt külön sterilizálva oltáskor adagoljuk a táptalajhoz. A lombikokat 28°C-on, síkrázógépen (250 fordulat/perc, 2,5 cm kitérés) 3 napig rázatjuk. A tenyészetekhez 72 órában 0,1 mg/ml végkoncentrációban mikofenolsavat adagolunk etilalkoholban oldva. A fermentációt az adagolást követően további 7 napon át folytatjuk.

A biokonverzió végén a 4,0 l térfogatú fermentáléhoz 2,0 l acetont és 4,0 l etil-acetátot adunk, majd a keveréket egy órán át kevertetjük. Ezt követően a



fázisokat szétválasztjuk, majd a vizes fázist még egyszer 4,0 l kloroformmal extraháljuk. A kivonatolások során kapott emulziós szerves fázisokból centrifugálással állítunk elő éles extraktumokat, amelyeket vákuumban bepárolunk, majd a kapott nyersterméket (2,0 g) 100 g Kieselgel 60 (szemcseméret: 0,063-0,2 mm; Reanal) adszorbensből készített oszlopon kromatografáljuk. A nyersterméket kloroform - metanol - 99,5 %-os ecetsav (8,5:1,5:0,01) elegyben oldva visszük fel az oszlopra és a kromatográfia során az előbbi elegyet alkalmazzuk kifejlesztő oldószerként. Az oszlop-kromatografáláskor 10 ml-es frakciókat szedünk, és a frakciókat vékonyréteg-kromatográfián vizsgáljuk Kieselgel 60 F<sub>254</sub> DC alufólia (Merck) adszorbenst és a fenti kifejlesztő elegyet alkalmazva (1 %-os etanolos FeCl<sub>3</sub>-as előhívás szobahőmérsékleten). A főként mikofenolsav-amidot tartalmazó frakciókat egyesítjük, majd a kapott oldathoz (120 ml) 40 ml ionmentes vizet adunk. A keverék kémhatását 1n nátrium-hidroxid oldattal pH = 4,0-4,5-re állítjuk. A fázisokat szétválasztjuk, majd a vizes fázist még egyszer 40 ml kloroformmal extraháljuk. Az egyesített extraktumot vákuumban bepároljuk, majd a kapott terméket (0,3 g) 30 g Kieselgel 60 (szemcseméret: 0,063-0,2 mm; Reanal) adszorbensből készített oszlopon tovább kromatografáljuk. A kromatografáló oszlopot 10 % etil-acetátot tartalmazó metilén-klorid - etil-acetát eleggyel készítjük és az elució során 10 %-onként növelt etil-acetát tartalmú metilén-klorid - etil-acetát elegyeket alkalmazunk. A kromatográfia során 15-20 ml-es frakciókat szedünk és a frakciókban a terméket vékonyrétegkromatográfián vizsgáljuk a fentiekben leírt körülmények között. (A vizsgálatok során etil-acetát - benzol (2:1) elegyet is alkalmazunk futtató rendszerként). A termék 40 % etil-acetát tartalmú metilén-klorid - etil-acetát eleggyel oldódik le az oszlopról. A terméket tartalmazó frakciókat vákuumban bepároljuk, és így 0,2 g kromatográfián tiszta mikofenolsav-amidot kapunk.

IR: 3433; 1737; 1665; 1622  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}} = 0$  ppm):  $\text{H}_2$ -3, 5,19 (s, 2H); 4-Me, 2,31 (s, 3H); 5-OMe, 3,76 (s, 3H);  $\text{H}_2$ -1', 3,38 (d,  $J=6,3$  Hz, 2H);  $\text{H}$ -2', 5,24 (t,  $J=6,3$  Hz, 1H); 3'-Me, 1,80 (s, 3H);  $\text{H}_2$ -4' és  $\text{H}_2$ -5', 2,14 (br, 4H)

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}} = 0$  ppm): C-1, 172,8; C-3, 70,0; C-3a, 144,1; C-4, 122,0; 4-Me, 11,4; C-5, 163,5; 5-OMe, 61,0; C-6, 116,7; C-7, 153,5; C-7a, 106,3; C-1', 22,5; C-2', 123,0; C-3', 134,2; 3'-Me, 16,0; C-4', 34,2; C-5', 34,9; C-6', 176,4

Tömegspektrumok

Elektron ionizációs (EI) tömegspektrum

Jellemző spektrum adatok:

EI (70 eV):  $([\text{M}]^{+\bullet})$  319,  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ ;  $m/z$  302,  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$ ,  $[\text{M} - \text{NH}_3]^{+\bullet}$ ;  $m/z$  301,  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ ,  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ ;  $m/z$  261,  $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_4$ ,  $[\text{M} - \bullet\text{CH}_2\text{CONH}_2]^+$ ;  $m/z$  207,  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_4$ ,  $[\text{M} - \bullet\text{C}_5\text{H}_8\text{CONH}_2]^+$ .

Kémiai ionizációs (CI) tömegspektrum

Jellemző spektrum adatok:

CI (*i*-bután):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  320;  $[\text{M}]^{+\bullet}$  319;  $m/z$  303,  $[\text{M}+\text{H} - \text{NH}_3]^+$ ;  $m/z$  207,  $[\text{M} - \bullet\text{C}_5\text{H}_8\text{CONH}_2]^+$ .

## 5. példa

A *Streptomyces resistomycificus* 1/28 jelű törzs (NCAIM (P)B 001276) CM jelű ferdeagaron növesztett tenyészetéről készített sejtszuszpenzióval a 4. számú

példában leírt módon végezzük az inokulum tenyészet készítését és a biokonverziót.

A biokonverzió végén a 4,5 l térfogatú fermentlevet a 4. példában leírt módon extraháljuk. Az extraktumok vákuumbepárlásával 3,8 g nyerterméket kapunk, amelyet 114 g Kieselgel 60 (szemcseméret: 0,063-0,2 mm; Reanal) adszorbensből készített kromatografáló oszlopon tisztítunk. A kromatográfiás tisztítás során kloroform - metanol - 99,5 %-os ecetsav (8,5:1,5:0,01) elegyet alkalmazunk kifejesztő rendszerként. A kromatografáláskor 15-20 ml-es frakciókat szedünk, amelyekben a terméket a 4. példában leírt módon vékonyrétegkromatográfiásan analizáljuk. Az analízisek során kloroform - metanol - 99,5 %-os ecetsav (8,5:1,5:0,1) elegyből álló futtató rendszert alkalmazunk. A főként hidroximetil-mikofenolsav-amidot tartalmazó frakciókat egyesítjük és az oldatot a 4. példában leírt módon feldolgozzuk a bepárláshoz. Az oldat bepárlása után kapott terméket (0,4 g) 40 g Kieselgel 60 (szemcseméret: 0,063-0,2 mm; Reanal) adszorbensből készített oszlopon tovább kromatografáljuk. A kromatografáló oszlopot kloroformban készítjük és az elució során 1 %-onként növelt metanol tartalmú kloroform - metanol elegyet alkalmazunk. A kromatográfia során 10 ml-es frakciókat szedünk és a frakciókban a terméket vékonyrétegkromatográfiásan vizsgáljuk a fentiekben leírt körülmények között. A termék 5 % metanol tartalmú kloroform - metanol eleggyel oldódik le az oszlopról. A terméket tartalmazó frakciókat vákuumban bepároljuk, és a kapott terméket (0,3 g) 300 ml Sephadex LH-20 (Pharmacia, Svédország) gélt tartalmazó oszlopon metanol oldószert alkalmazva tovább tisztítjuk. A gél-sűrítési kromatográfia során 10 ml-es frakciókat szedünk és a frakciókat vékonyrétegkromatográfiásan vizsgáljuk a fentiekben leírt körülmények között. A terméket tisztán tartalmazó frakciókat egyesítjük és vákuumban bepároljuk. Így 0,22 g kromatográfiásan egységes hidroximetil-mikofenolsav-amidot kapunk.

A kapott termék spektroszkópai jellemzői:

IR: 3339; 1735; 1657; 1615  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}} = 0$  ppm):  $\text{H}_2$ -3, 5,41 (s, 2H); 4- $\text{CH}_2$ -OH, 4,68 (s, 2H); 5-OMe, 3,78 (s, 3H);  $\text{H}_2$ -1', 3,38 (d,  $J=6,5$  Hz, 2H); H-2', 5,26 (t,  $J=6,5$  Hz, 1H); 3'-Me, 1,80 (s, 3H);  $\text{H}_2$ -4' és  $\text{H}_2$ -5', 2,25 (br, 4H)

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}} = 0$  ppm): C-1, 173,6; C-3, 71,5; C-3a, 146,8; C-4, 122,0\*; 4- $\text{CH}_2\text{OH}$ , 57,8; C-5, 164,1; 5-OMe, 62,9; C-6, 123,6\*; C-7, 156,1; C-7a, 108,2; C-1', 23,4; C-2', 124,2; C-3', 135,3; 3'-Me, 16,2; C-4', 35,3; C-5', 36,5; C-6', 178,7.

Tömegspektrumok

Pozitív (+) és negatív (-) FAB spektrumok

Jellemző spektrum adatok:

+ és - FAB (xenon, 9 kV):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  336;  $m/z$  318,  $[\text{M}+\text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ ;  $[\text{M}-\text{H}]^-$  334.

## Szabadalmi igénypontok

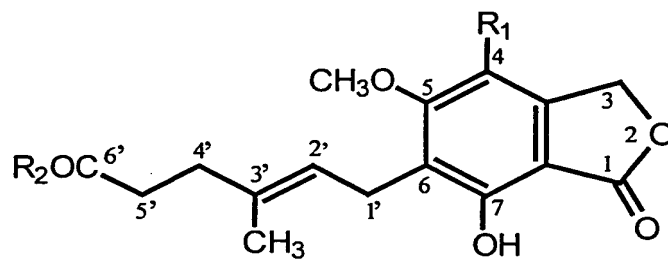
1. Mikrobiológiai eljárás az (I) általános képletű vegyületek előállítására, ahol  $R_1$  jelentése metil- vagy hidroximetil-csoport, továbbá  $R_2$  hidroxil- vagy aminocsoportot jelent, azzal jellemezve, hogy a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM (P)F 001269 számon letétbe helyezett *Penicillium waksmani* gombatörzset asszimilálható szén- és nitrogénforrásokat, valamint ásványi sókat tartalmazó táptalajon 22-30°C-on tenyésztjük és a képződött (I) általános képletű vegyületet, ahol  $R_1$  jelentése metilcsoport és  $R_2$  jelentése hidroxilcsoport, a fermentléből elkülönítjük és kívánt esetben tisztítjuk, majd kívánt esetben
- a) olyan (I) általános képletű vegyület előállítására, ahol  $R_1$  jelentése metilcsoport és  $R_2$  jelentése aminocsoport, a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM (P)B 001275 számon letétbe helyezett *Streptomyces sp.* baktérium törzs tenyészetével vagy
- b) olyan (I) általános képletű vegyület előállítására, ahol  $R_1$  jelentése hidroximetil-csoport és  $R_2$  jelentése aminocsoport, a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében NCAIM (P)B 001276 számon letétbe helyezett *Streptomyces resistomycificus* baktérium törzs tenyészetével
- asszimilálható szén- és nitrogénforrásokat, valamint ásványi sókat tartalmazó táptalajon, süllyesztett, levegőztetett körülmények között a biokonverzió befejeződéséig fermentáljuk, majd a keletkező (I) általános képletű vegyületet a tenyészetből elkülönítjük és kívánt esetben tisztítjuk.

40

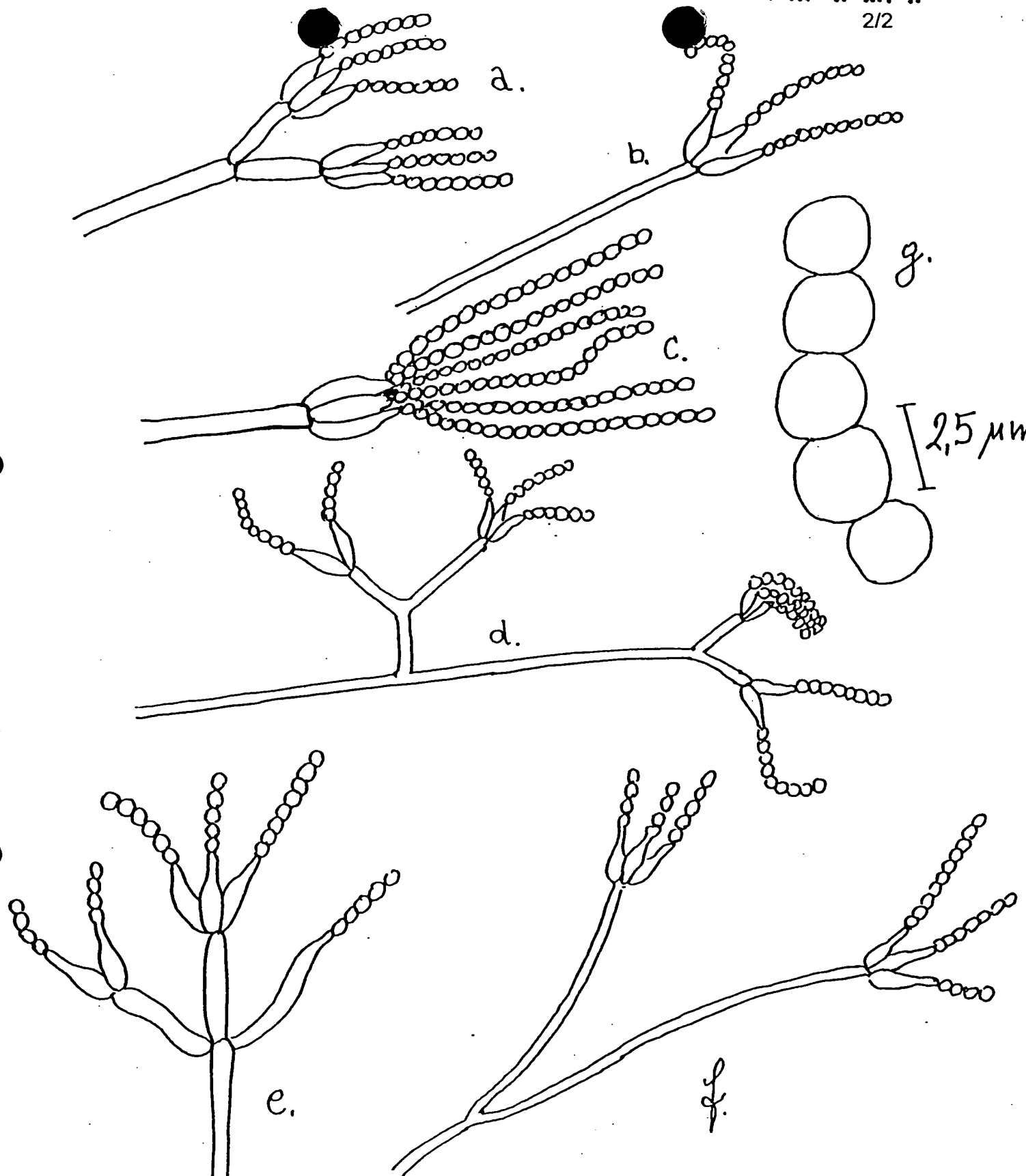


GYÓGYSZERKUTATÓ INTÉZET KFT

Best Available Copy



(I)



Best Available Copy ábra

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**